

Министерство образования и науки РФ

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

УДК547.74:78

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по науке
_____ Кружаев В.В.
«__» _____ 2013

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках выполнения п.2.1.2.1 Плана реализации мероприятий Программы развития
УрФУ на 2013 год

ПО ТЕМЕ:

«Установление зависимости "структура-активность" на основе анализа возможных
биологических превращений препарата "Триазавирин"» (Заключительный)

Зав.кафедрой,
научный руководитель

(подпись, дата)

О.Н. Чупахин

Научный руководитель

(подпись, дата)

Е.Н. Уломский

Исполнитель

(подпись, дата)

Н.Р. Медведева

Екатеринбург 2013

Реферат

1. ФИО автора:

Медведева Наталья Розыевна

Medvedeva Natalia Rozyevna

2. Аннотация:

Разработаны удобные методы получения некоторых продуктов возможных биотрансформаций препарата «Триазавирин», а также исследована биологическая активность этих соединений. Исследована реакция нуклеофильного замещения нитрогруппы S- и N-нуклеофилами. Показана возможность замещения нитрогруппы биогенными нуклеофилами. Исследованы окислительные превращения «Триазавирин» и химические свойства продуктов окисления.

Convenient methods for the preparation of possible biotransformation products of "Triazavirin" were developed, and biological activity of these compounds was investigated. The reaction of nitro-group nucleophilic substitution by S-and N-nucleophiles was studied. The possibility of nitro group substitution by biogenic nucleophilic agents was shown. The oxidative conversion of "Triazavirin" and the chemical properties of the products of oxidation were studied.

3. Ключевые слова:

Реакции окисления, реакции нуклеофильного замещения, противовирусная активность, пептиды, ферменты.

Oxidation reactions, nucleophilic substitution reaction, antiviral activity, peptides, enzymes.

4. Тема отчета:

Установление зависимости "структура-активность" на основе анализа возможных биологических превращений препарата "Триазавирин".

Determination of "structure-activity" relationship based on analysis of possible biological transformations of the "Triazavirin" drug.

Содержание

Обозначения и сокращения.....	4
Введение.....	5
Обсуждение результатов	7
Заключение	22
Список использованных источников	23

Обозначения и сокращения

Ac – ацетил;

Bn – бензил;

Et – этил;

Me – метил;

NH-кислота – 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин(4H)-7-он;

Ph – фенил;

РОМ, ПОМ – пивалоилоксиметил;

Pr – пропил;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДМФА – N,N-диметилформамид;

м.д. – миллионные доли;

6-морфолил-ТБТТ – 2-метилтио-4-третбутил-6-морфолил-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он;

6-нитро-ТБТТ – 2-метилтио-4-третбутил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он;

ПТСК – пара-толуолсульфокислота;

РСА – рентгеноструктурный анализ;

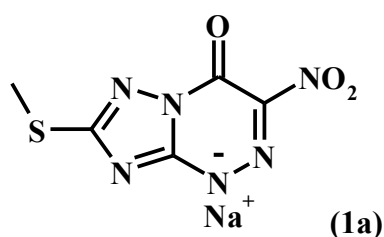
ТБ – трет-бутанол;

ТФУК – трифторуксусная кислота;

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс.

Введение

Конденсированные азолотриазины относятся к важному классу азотсодержащих гетероциклических систем, представленных широким рядом соединений, обладающих противовирусной активностью, среди которых стоит отметить препарат «Триазавирин» широкого спектра действия. В то же время, механизм противовирусного действия, а также влияние различных заместителей на биологическую активность соединений этого ряда не известны. Таким образом, является актуальным исследование зависимости «строение-активность», а также моделирование возможных биологических процессов с участием молекулы «Триазавирина» с целью исследования механизма его действия и направленного поиска новых более активных соединений.



Поводом к поиску активных первичных метаболитов «Триазавирина» явился тот факт, что сам препарат не активен в экспериментах на клеточных культурах в отличие от экспериментов *in vivo*.

Исследования последних десятилетий показали ключевое влияние наличия нитрогруппы в молекуле азолазинов на биологическую активность. Таким образом, целесообразным является моделирование биохимических процессов, относящихся к этой функциональной группе - восстановление под действием редуктаз, а также нуклеофильное замещение нитрогруппы, которое может происходить под действием белков клетки с образованием уже активного соединения, либо взаимодействуя с белками активного центра нейраминидазы вируса и проявляется действие «Триазавирина».

Что касается окисления алкилтиогрупп при использовании «Триазавирина» и его аналогов, то нужно отметить, что при большинстве вирусных инфекций уже на ранней стадии процесса происходит усиление генерирования активных форм кислорода^{1,2}. В частности, это относится к синглетному кислороду и другим производным O^{\cdot} , NO^{\cdot} , H_2O_2 , $ONOO^{\cdot}$, HO^{\cdot} . Следует обратить особое внимание на нитропероксидный радикал $ONOO^{\cdot}$, генерирование которого особенно активно при вирусных инфекциях. Вирус гриппа (и другие патогенные вирусы) вызывают индукцию синтеза iNOS – индуцируемой NO–синтазы, что приводит к избытку в тканях и периферической крови NO. Естественно, в условиях активной продукции радикалов кислорода основная масса NO переходит в

состояние нитропероксидного аниона. Эти процессы сопровождаются нитрозильным стрессом и активным нитропероксидным нитрозилированием белков, их инактивации и нарушению клеточных функций. Известно также негативное действие пероксинитрита на токсичность известных и широко используемых лекарственных препаратов ^{1,2}. В этих условиях могут происходить реакции окисления S-метильной группы «Триазавирина», свойственные, например, для аминокислоты метионина при окислительном стрессе и активация нитрогруппы в 6-положении молекулы «Триазавирина» с превращением ее в нестабильный нитрозильный радикал.

Таким образом, в данной работе были проведены модельные эксперименты с препаратом «Триазавирин» - изучение окисления S-метильной группы и поведения продуктов окисления по действию S- и N-нуклеофилов. Такой подход позволяет, с одной стороны, предсказать течение химических реакций, сопутствующих поведению «Триазавирина» в организме, а с другой стороны, путем синтеза соответствующих соединений смоделировать процесс образования ковалентных связей азола[5,1-с]1,2,4-триазинов с S и N-фрагментами ключевых белков как клетки, так и вируса, который может протекать как часть механизма противовирусного действия «Триазавирина» и его аналогов. Помимо этого такие синтезы могут иметь самостоятельный интерес для получения новых производных «Триазавирина» для биологического тестирования.

Обсуждение результатов

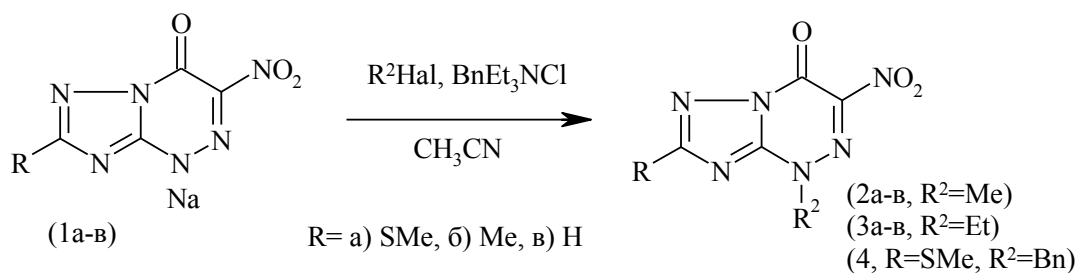
1. Алкилирование 2-R-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она

Введение алкильных группировок в положение 4 триазолотриазинового цикла способствует протеканию нуклеофильного замещения нитрогруппы, так как в этом случае не наблюдается образование анионов, устойчивых к воздействию нуклеофильными реагентами. Кроме того, данные фрагменты в некоторых случаях могут выступать в качестве защитных групп и удаляться после замещения нитрогруппы.

Как сообщалось в предыдущих работах³, триазолотриазины эффективно алкилируются алкилгалогенидами в ДМФА с образованием 4-алкилпроизводных. Нами был предложен синтетический подход, основанный на алкилировании триазолотриазинонов путем превращения натриевых солей (1а-в) в бензилтриэтиламмонийные производные с последующим кипячением в ацетонитриле (схема 1). В качестве алкилирующих агентов были использованы йодистый метил, йодистый этил и бензилхлорид.

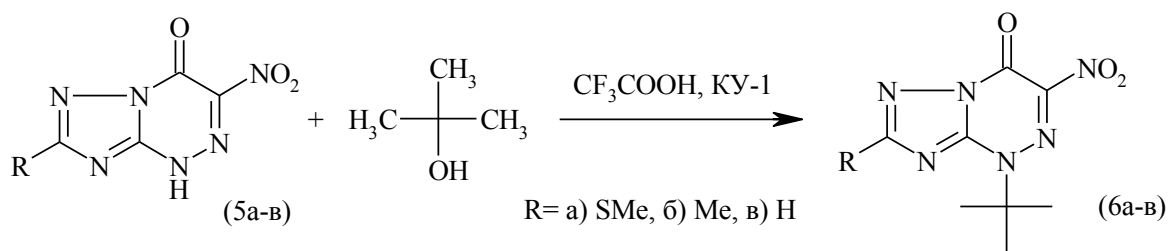
Данная синтетическая стратегия характеризуется отсутствием региоселективности: продукты реакции представляют собой смесь изомерных триазолотриазинонов, алкилированных по положениям 1, 3 и 4⁵.

Схема 1



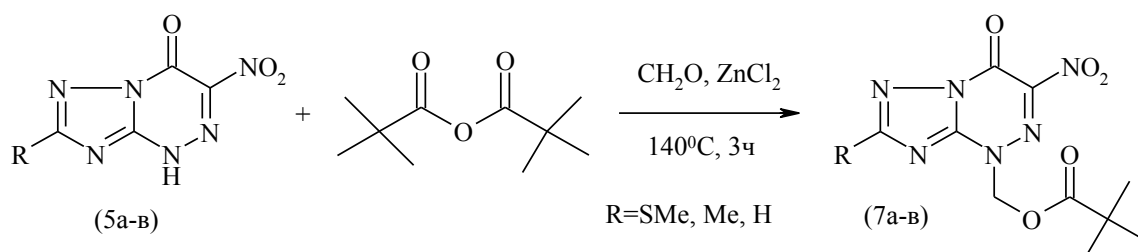
Было установлено, что взаимодействие 2-R-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазина с *трет*-бутанолом в трифторуксусной кислоте в присутствии катионообменной смолы КУ-1 протекает региоселективно, в результате образуются 2-R-4-*трет*-бутил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины (ба-в) с выходом от 60 до 95% (схема 2).

Схема 2



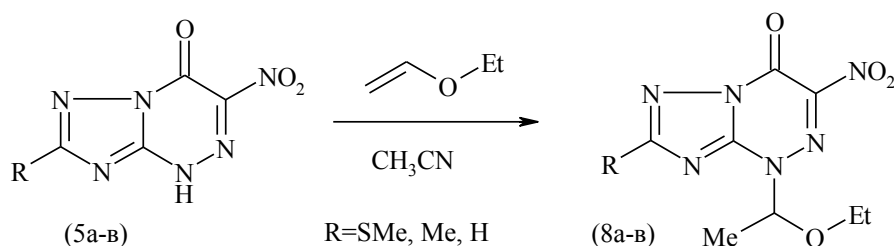
Введение в положение 4 триазолотриазинового цикла пивалоилоксиметильного остатка обусловлено возможностью его применения в качестве защитной группы, удаляемой в основных условиях, а также структурной аналогией с фрагментом рибозы, что придает алкилированному продукту сходство с ациклонуклеозидами.

Схема 3



Для получения 2-R-4-пивалоилоксиметил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины (7а-в) была использована реакция 2-R-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с пивалевым ангидридом и параформом в присутствии хлорида цинка (схема 3). Выход продуктов (7а-в) составляет 55-93%.

Схема 4



Взаимодействие 2-R-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с винилэтиловым эфиром приводит к образованию 2-R-4-этоксипропил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов (8а-в). Реакция была осуществлена в сухом ацетонитриле при комнатной температуре, выход продуктов (8а-в) при этом составляет 40-80% (схема 2.4). Производные (8а-в) представляют собой неустойчивые в водных средах соединения, которые гладко превращаются в соответствующие незамещенные аналоги.

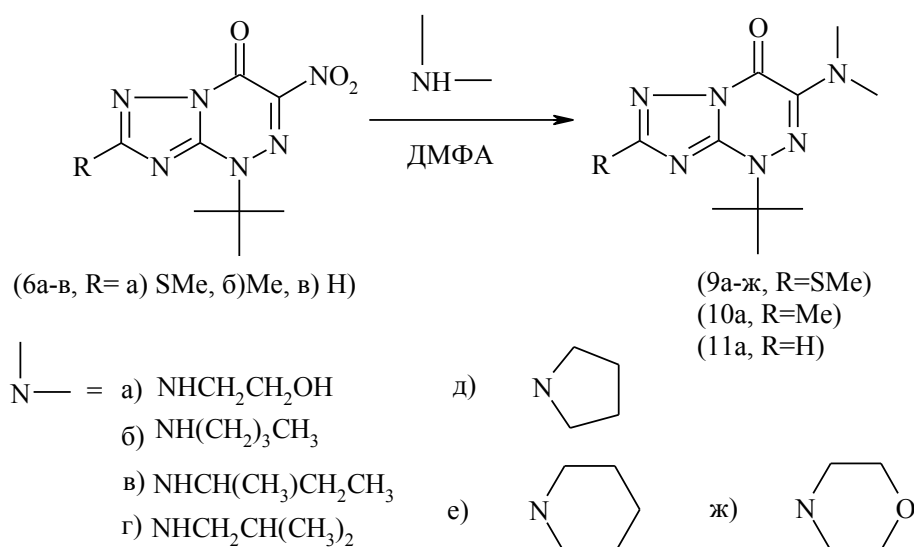
Характерной особенностью спектров ЯМР ^1H соединений (8а-в) является наличие дополнительного расщепление сигналов, вызванное спин-спиновым взаимодействием магнитно-неэквивалентных протонов метиленовой группы OCH_2 в алкильном остатке, при этом регистрируются два сигнала в виде однопротонных мультиплетов.

2. Нуклеофильное замещение нитрогруппы

Следующим этапом работы стала разработка методологических подходов, основанных на нуклеофильном замещении нитрогруппы в синтезированных ранее соединениях (2-4, 6-8).

Было обнаружено, что взаимодействие 4-трет-бутил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины (6а-в) с N-нуклеофилами наиболее легко проходит в случае использования первичных аминов (этанолamina и бутиламина). Реакции с вторичными аминами (бутиламином, диалкиламинами и циклоалкилиминами) требуют более жестких условий (схема 5).

Схема 5



Образование продуктов замещения нитрогруппы (9-11) происходит при кипячении реакционной смеси с тройным избытком амина в ДМФА в течение 2 часов в случае первичных аминов и 15 часов при использовании вторичных, в частности циклических, аминов. Целевые продукты были выделены с помощью колоночной хроматографии с использованием смеси этилацетат : гексан в различных соотношениях в качестве элюента, выход продуктов при этом составил 28-77%.

Строение синтезированных соединений было установлено на основании данных ЯМР ^1H спектроскопии и элементного анализа. В спектрах ЯМР ^1H регистрируются

сигналы протонов метилсульфанильной ($\delta=2.63-2.69$ м.д.) и трет-бутильной групп ($\delta=1.68-1.73$ м.д.) в виде 3-ех и 9-ти протонных синглетов соответственно, а также мультиплеты аминоалкильных фрагментов ($\delta=0.96-4.26$ м.д.).

Данные о пространственном строении синтезированного триазолотриазинона (9ж) были подтверждены методом рентгеноструктурного анализа (рис. 1).

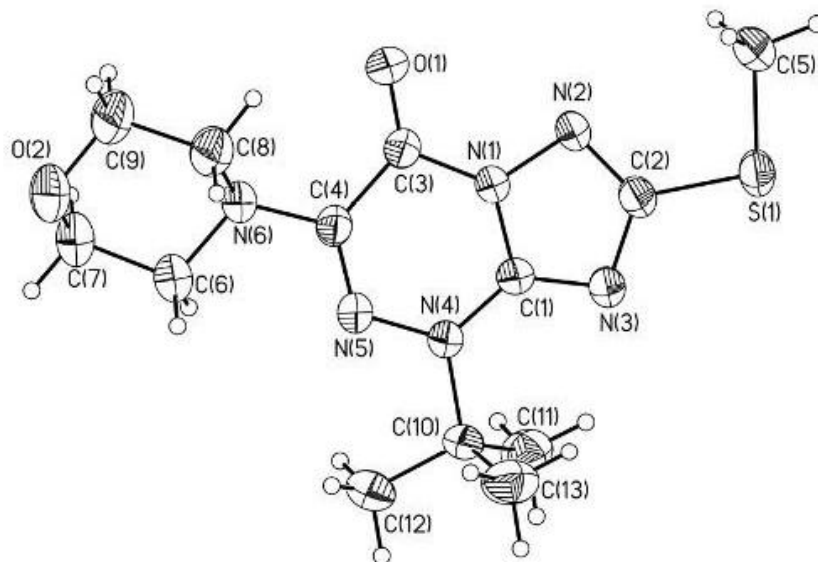
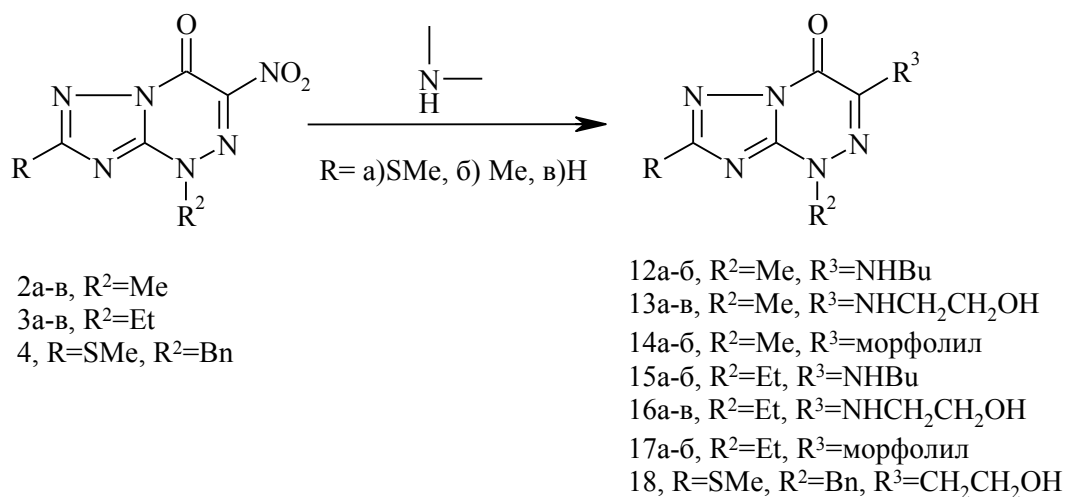


Рис. 1. Структура 4-*tert*-бутил-6-морфолил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*]-1,2,4-триазина

В результате взаимодействия 4-*R*-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*]-1,2,4-триазинов с некоторыми N-нуклеофилами был получен ряд соединений (12-18). Для проведения данных превращений были использованы те же условия, что и в случае замещения нитрогруппы в 4-*tert*-бутил-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*]-1,2,4-триазине: тройной избыток амина в ДМФА при нагревании (схема 6). Продукты реакции были выделены с помощью колоночной хроматографии.

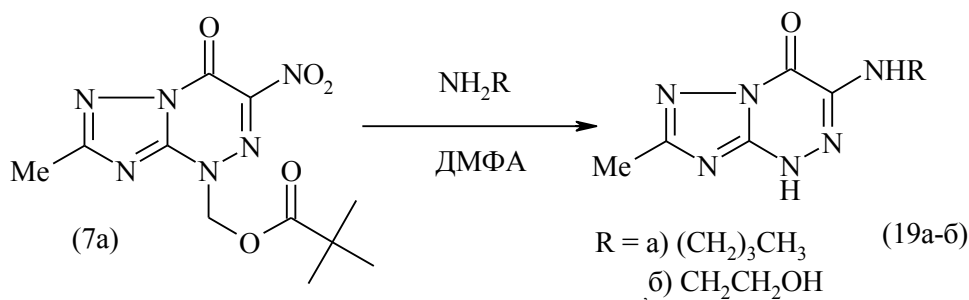
Схема 2.6



При попытке заместить нитрогруппу в 4-пивалоилоксиметил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазине было установлено, что одновременно с замещением нитрогруппы происходит отщепление пивалоилоксиметильного фрагмента с образованием 6-алкиламинотриазоло[5,1-с]-триазинов (19а-б) (схема 7).

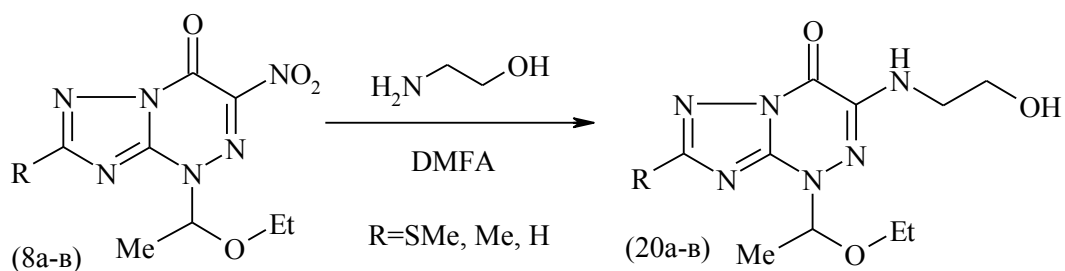
Спектры ЯМР ¹Н синтезированных соединений характеризуются отсутствием синглетов трет-бутильной и метиленовой групп пивалоилоксиметильного фрагмента, а также наличием сигнала протона гетероциклической группы NH (δ=11.40-13.24 м.д.) в виде уширенного синглета.

Схема 7



Замещение нитрогруппы в соединениях 8а-в на остаток этаноламина протекает практически мгновенно при комнатной температуре в ДМФА (схема 8). Продукты замещения были выделены с помощью флэш-хроматографии в системе этилацетат : гексан = 4 : 1.

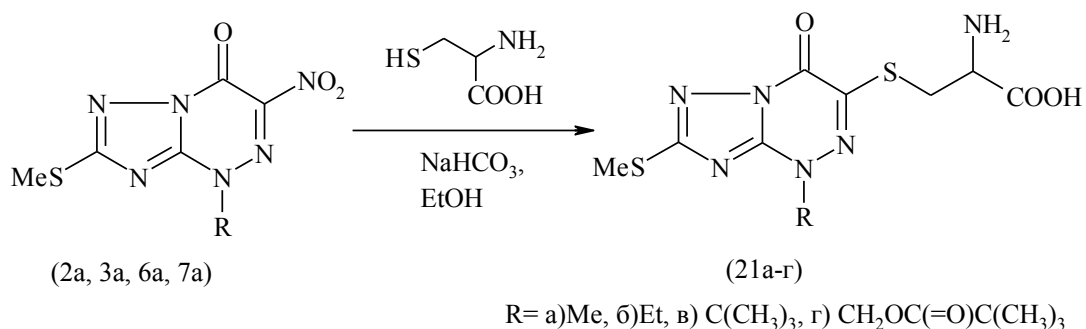
Схема 8



С целью получения данных о возможных метаболических превращениях «Триазавирина» и его структурных аналогов были исследованы некоторые реакции замещения нитрогруппы на биогенные S-нуклеофилы, такие как цистеин и глутатион. Глутатион является биогенным трипептидом, в структуру которого входят остатки глицина, L-цистеина и L-глутаминовой кислоты, и содержит пептидную связь между аминогруппой цистеина и γ -карбоксигруппой глутаминовой кислоты. Данные превращения представляет собой модельные реакции возможного замещения нитрогруппы сульфгидрилами цистеинсодержащих белков.

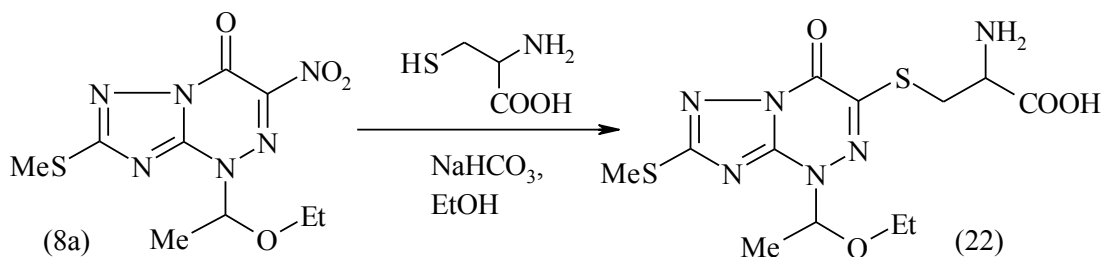
Так, замещение на цистеин проводилось в этаноле с одним эквивалентом гидрокарбоната натрия при комнатной температуре (схемы 9, 10), в результате были получены продукты замещения (21a-г).

Схема 9



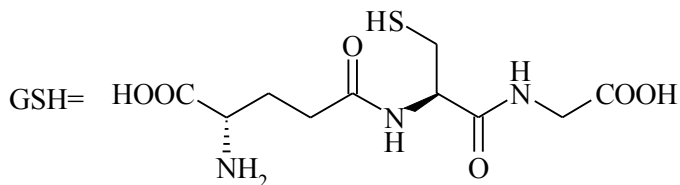
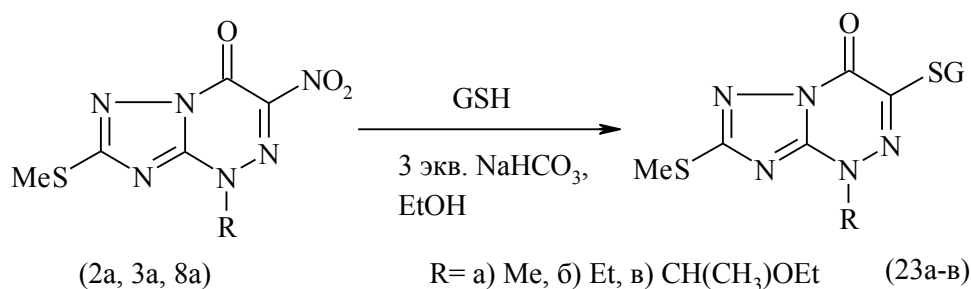
В спектрах ЯМР ^1H присутствуют синглет метилтиогруппы ($\delta=2.63\text{-}2.66$ м.д.), сигналы алкильных заместителей в положении 4 и сигналы протонов остатка цистеина. Сигналы протонов группы SCH_2 проявляются в виде двух отдельных однопротонных дублетов дублетов ($J=15.0, 7.2, 4.9$).

Схема 10



Стоит отметить, что производное (22) обладает ограниченной стабильностью, вызванной легкостью отщепления этоксиэтильной группы, что приводит к образованию смеси алкилированных по положению 4 триазоло[5,1-с]-триазинов и их незамещенных аналогов.

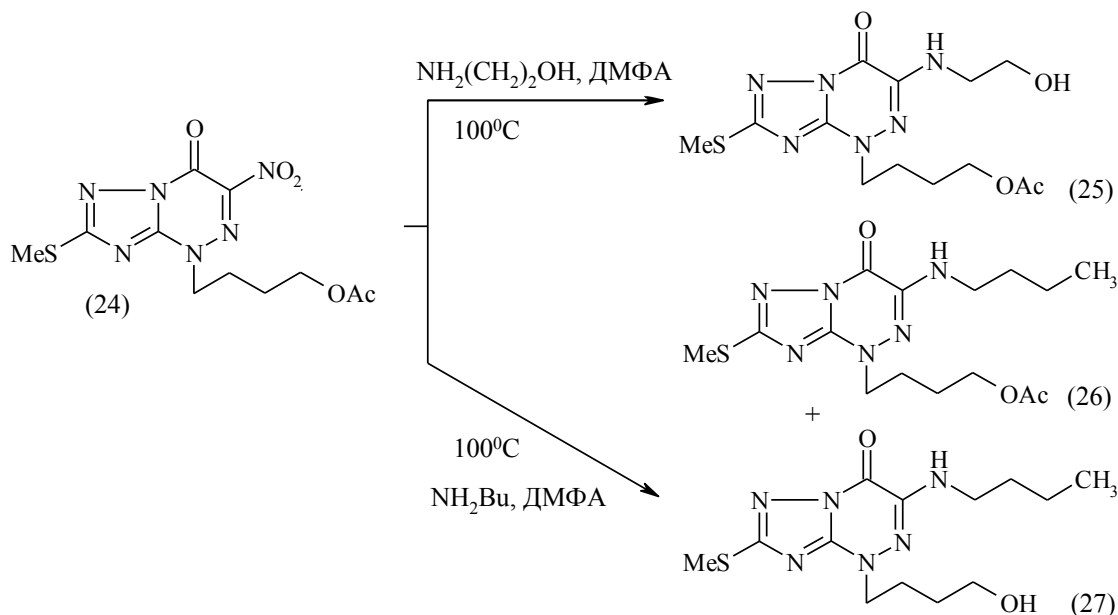
Схема 11



Замещение на глутатион, представляющий собой трипептид, было проведено в этаноле с тройным избытком гидрокарбоната натрия с выходом 30-65%. В спектре полученных соединений, как и в случае соединений (21a-г, 22), наблюдается расщепление сигналов протонов группы SCH₂, представленных в виде дублета дублетов (J=15.0, 7.2, 4.9).

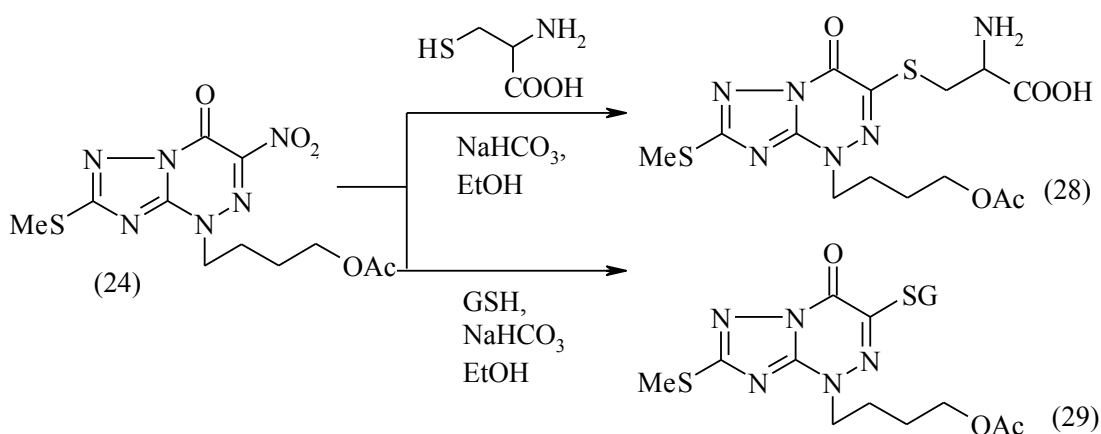
Кроме того, замещение нитрогруппы также было проведено в 2-метилтио-4-(4-ацетоксибутил-1)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-оне (24), так называемом «аномальном нуклеозиде» (схемы 12, 13).

Схема 12



Взаимодействие соединения (24) с этаноламином в ДМФА при 100°C проходит с получением единственного продукта (25) с выходом 85%. При замещении нитрогруппы на бутиламиновый фрагмент было выделено 2 продукта: 6-н-бутиламинозамещенный триазоло[5,1-с]триазин (26) с выходом 40% и 4-гидроксibuтил-6-бутиламино-триазоло[5,1-с]-триазин с выходом 35%. Таким образом, одновременно с нуклеофильным замещением под действием амина проходит частичный гидролиз ацетильной защитной группы.

Схема 13



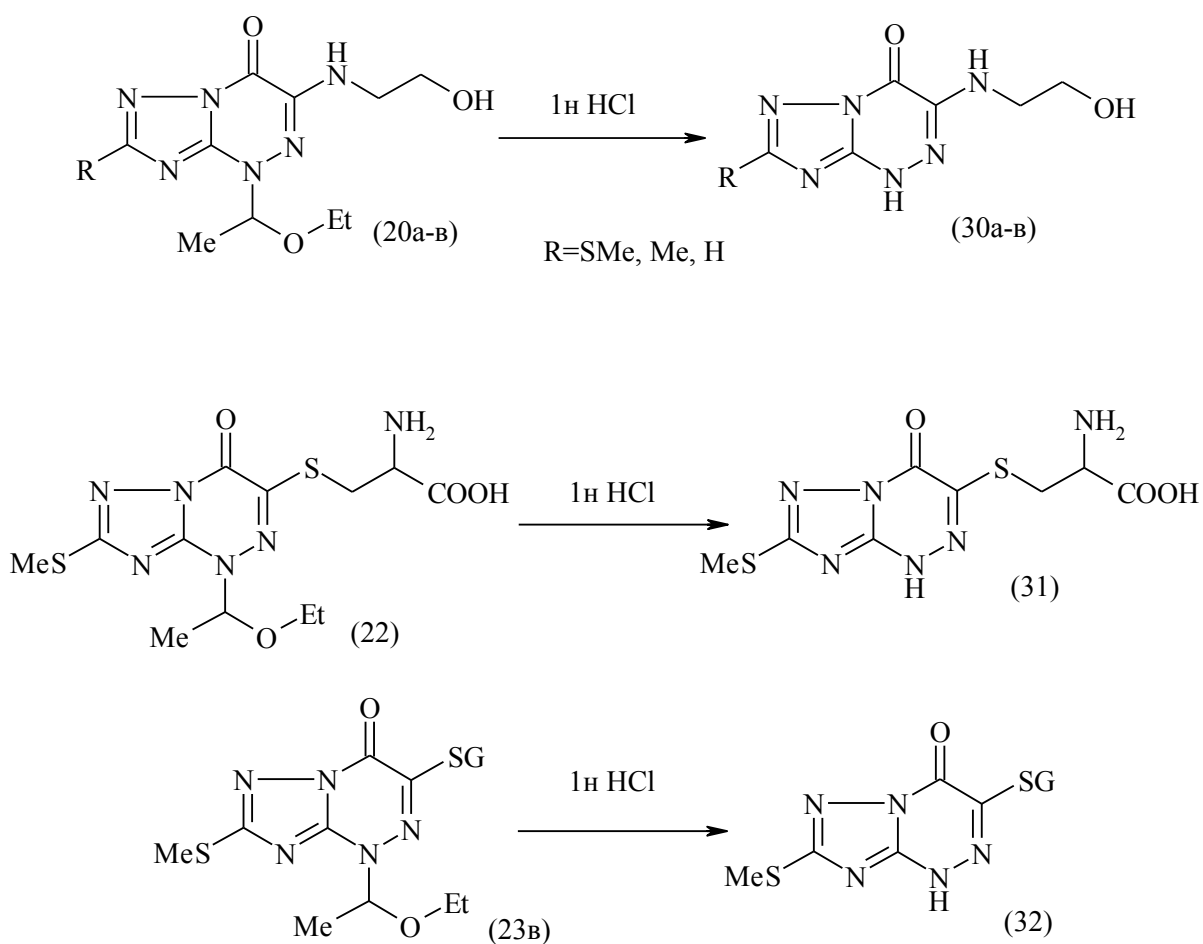
Замещение нитрогруппы в соединении (24) на цистеин и глутатион проводили в присутствии гидрокарбоната натрия в этаноле. Полученные продукты замещения очищали перекристаллизацией из 50% этанола.

3. Удаление защитных групп

Следующим этапом работы стало получение незамещенных по положению 4 триазолотриазинового цикла продуктов замещения нитрогруппы посредством удаление защитных групп в полученных ранее соединениях.

Было установлено, что удаление этоксиэтильной группы осуществляется в относительно мягких условиях. Реакция была проведена в 1н растворе соляной кислоты при температуре от 25 до 40°C в течение 4-72 часов. В результате были получены соединения (30а-в, 31, 32) (схема 14) с выходом.

Схема 14



В ЯМР ^1H спектрах производных отсутствуют мультиплеты этоксиэтильного фрагмента. Строение соединения (31) было установлено с помощью рентгеноструктурного анализа, 2-метилтио-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазол[5,1-с]-1,2,4-триазин представляет собой монохлорид моногидрат. Структура молекулы приведена на рис. 2.

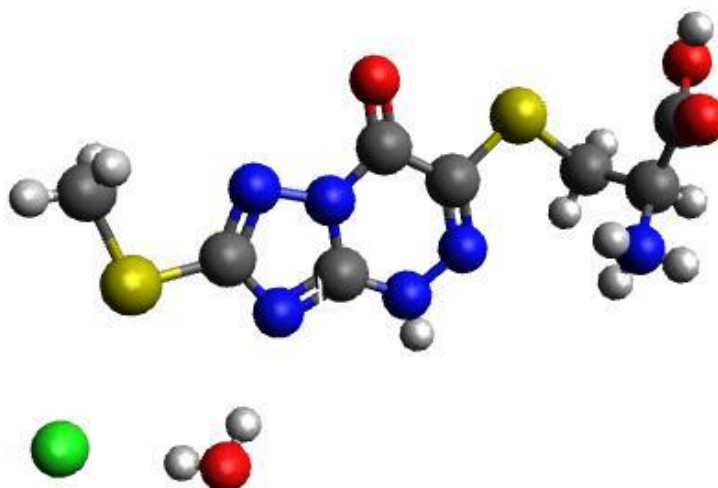
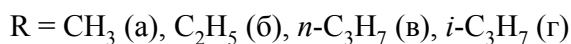
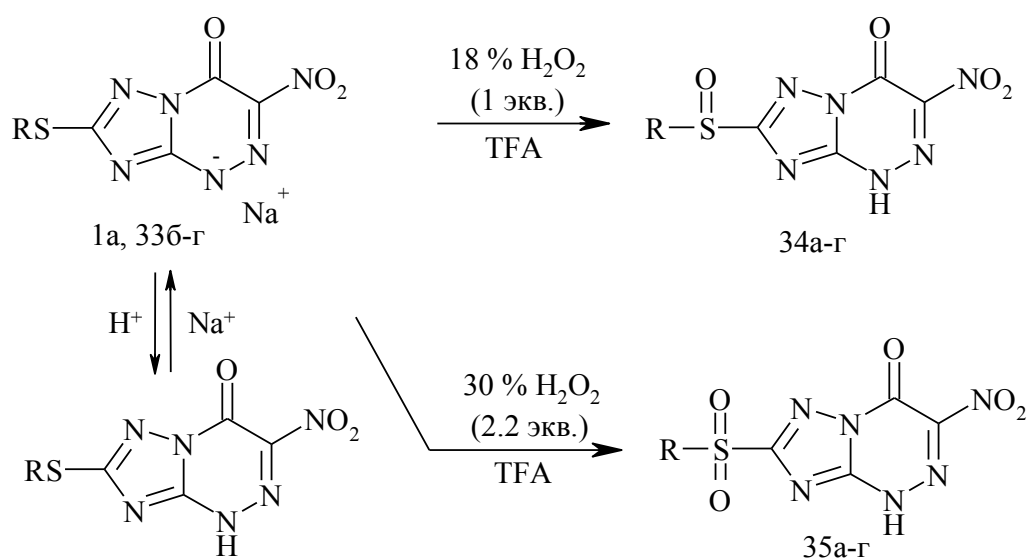


Рис. 2. Структура 2-метилтио-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазол[5,1-с]-1,2,4-триазина

4. Окисление «Триазавирина»

Окисление сульфгидрильной группы в молекулах натриевых солей 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-онов (1а, 33а-в) или сопряженных с ними кислот приводят к образованию гетероциклических сульфоксидов и сульфонов. Селективность окисления определяется стехиометричностью соотношения реагентов. При обработке соединений (1а, 33б-г) эквимольным количеством 18% пероксида водорода в трифторуксусной кислоте получены сульфоксиды (34а-г) (схема 1).

Схема 15



Строение соединений (34а-г) установлено на основании ЯМР, ИК-спектроскопии и данных элементного анализа. Так, в спектрах ^1H ЯМР алкилсульфоксидов (34а-г)

присутствуют сигналы алкильных групп R, а также уширенный однопротонный сигнал NH-группы в области $7,46 \div 11,15$ м.д. В сравнении со спектрами исходных соединений (1,33)^{4,5,6}, в спектрах сульфоксидов (34а-в) наблюдается сдвиг сигналов протонов фрагментов S-CH в область слабого поля ($\Delta\delta = 0,3 \div 0,4$ м.д.). Спектры ^{13}C ЯМР триазоло-1,2,4-триазинов (34) представлены сигналами алкильных групп в области 6-54 м.д. и резонансными пиками гетероциклических C-атомов. В ИК-спектрах полученных соединений присутствуют характерные полосы, соответствующие валентным колебаниям сульфоксидной группы ($\nu \text{ S=O } 992 \div 1036 \text{ см}^{-1}$)⁵.

Постепенным прибавлением избытка 2,2 эквивалента 30% H_2O_2 к суспензии 2-алкилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с]триазинов (1а, 33б-г) в трифторуксусной кислоте при комнатной температуре было осуществлено окисление до соответствующих сульфонов (35а-г) с выходами 62-71% (схема 15).

В спектрах ^1H ЯМР соединений (35а-г) наблюдается еще большее, чем в случае сульфоксидов (34а-г) смещение сигналов протонов групп SCH_3 в слабое поле ($\Delta\delta = 0,5 \div 0,7$ м.д.) в сравнении с исходными соединениями (1а, 33б-г)^{4,5,6}. В ИК-спектрах полученных веществ присутствуют характерные полосы поглощения групп, соответствующие валентным колебаниям сульфонильной группы ($\nu_{\text{as}} \text{ SO}_2 1293 \div 1347 \text{ см}^{-1}$ и $\nu_{\text{s}} \text{ SO}_2 1135 \div 1140 \text{ см}^{-1}$)⁵.

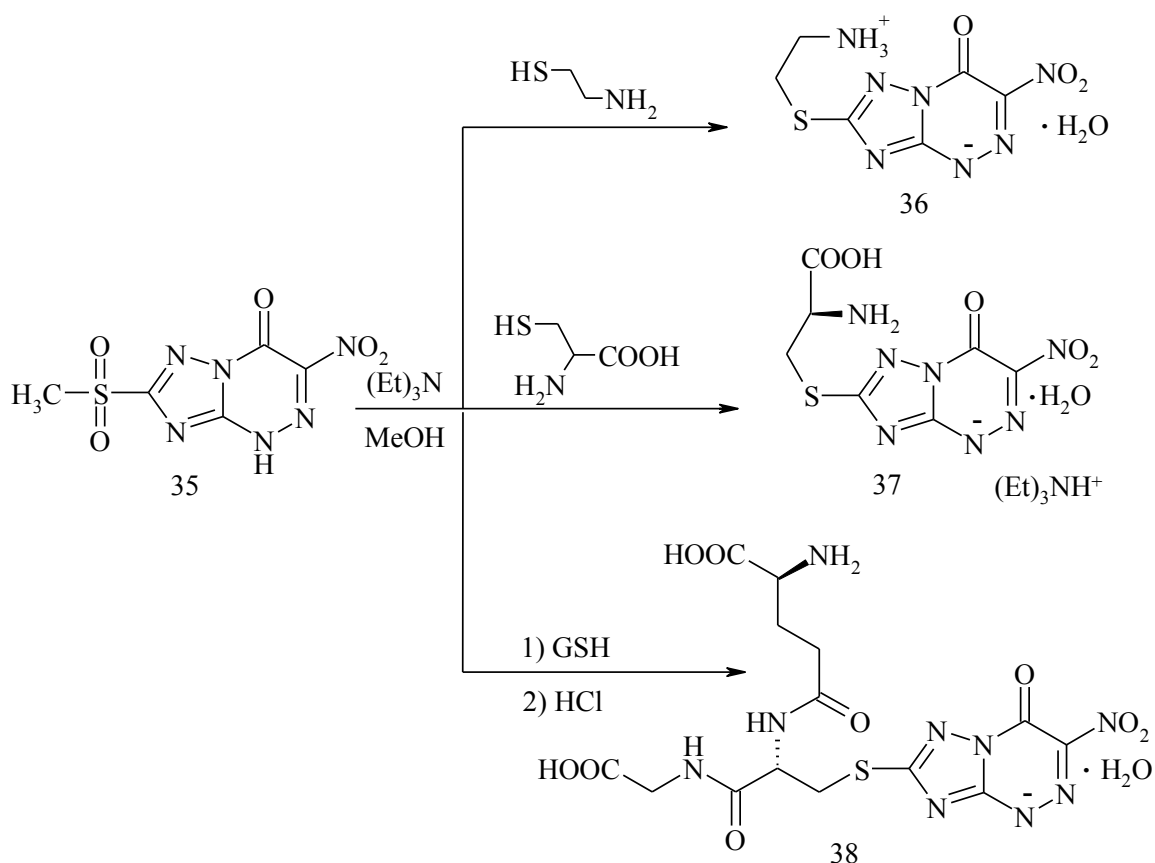
Представленные реакции моделируют возможные метаболические превращения «Триазавирина» и его производных под действием активных форм кислорода, включая H_2O_2 .

Что касается поведения нитрогруппы в «Триазавирине», то из литературных данных известно, что кроме восстановления в 4-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-оны NO_2 -группа способна к замещению под действием нуклеофилов [17]. В свою очередь, алкилсульфонильные фрагменты также восприимчивы к подобным превращениям [18-20]. В 2-алкилсульфонил-1,2,4-триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онах (35) присутствуют два электрофильных центра, доступных к нуклеофильной атаке. Эта ситуация представляет интерес для исследования сравнительной реакционной способности легкоуходящих групп в триазольном и триазиновом циклах соединений (35), а также как модель поведения «Триазавирина» в организме. В качестве нуклеофильных реагентов в настоящей работе использовались нуклеофилы (цистеин, цистеамин и глутатион), которые можно рассматривать с одной стороны как модели фрагментов белков, содержащих цистеиновый фрагмент и позволяющие вводить биогенные фрагменты в молекулу 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазина. Замещение сульфонильного фрагмента в 2-метилсульфонил-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазине (35а) под действием

S-нуклеофилов происходит при кипячении в сухом метаноле в присутствии триэтиламина в течение нескольких дней с образованием веществ (36-38) – продуктов замещения метилсульфонильной группы с выходами 27-46% (схема 16).

Заместить алкилсульфоксидную группу в соединениях (34а-г), в описанных выше условиях не удалось.

Схема 16



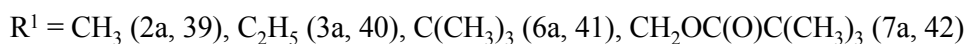
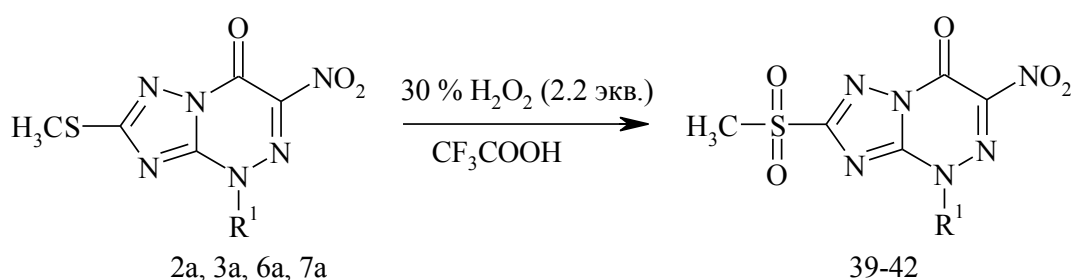
Данные ЯМР, ИК-спектроскопии и элементного анализа для соединений (36-38) соответствуют приписываемым структурам. В ^1H ЯМР спектре триэтиламмониевой соли 2'-амино-2'-карбокسيэтилтриазолотриазина (37) наблюдаются сигналы протонов цистеинового фрагмента, при этом видно расщепление протонов группы SCH_2 , каждый из которых представлен дублетом дублетов ($\delta = 3,65$ м.д., $^n\text{J} = 15.2, 7.5$; $\delta = 3.98$ м.д., $^n\text{J} = 15.2, 3.8$), а также сигналы трех этильных групп катиона триэтиламмония. В ^1H ЯМР спектре триазолотриазина (38) присутствуют только сигналы протонов, принадлежащие глутатионовому пептидному фрагменту. В спектре, как и для соединения (37) наблюдается расщепление сигналов протонов группы SCH_2 , представленных дублетом дублетов ($\delta = 3,51$ м.д., $^n\text{J} = 14.5, 8.8$; $\delta = 3.90$ м.д., $^n\text{J} = 14.5, 4.4$). В спектре ^1H ЯМР спектре соединения (36) также присутствуют только триплеты цистеаминового фрагмента, что обусловлено образованием цвиттер-иона. Отсутствие в ^1H ЯМР всех трех продуктов замещения трехпротонного синглета метильной группы в области 3,27 м.д., а

также исчезновение в ИК-спектрах характерных полос поглощения сульфонильной группы и наличие характеристических частот нитрогруппы ($\nu \text{ NO}_2$ 1504÷1505 см^{-1} и 1361÷1375 см^{-1}) свидетельствует о замещении именно метилсульфонильного фрагмента. Данный факт, а также результаты элементного анализа является аргументами в пользу предположения о возможном участии алкилсульфонильного фрагмента в метаболических превращениях «Триазавирина».

При попытке замещения метилсульфонильной группы в соединении (35a) такими N-нуклеофилами, как морфолин и глицин, были получены соответствующие триазолотриазинаты алкиламмония⁷, инертные к нуклеофильному действию аминов. Высокая NH-кислотность 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов и способность к образованию солей вообще является значимым препятствием замещения нитрогруппы^{8,9}. При блокировании NH протона за счет введения алкильной группы в положение N(4) триазоло-1,2,4-триазиновой структуры значительно облегчает замещение нитро-группы под действием нуклеофилов⁸.

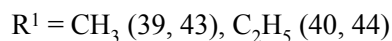
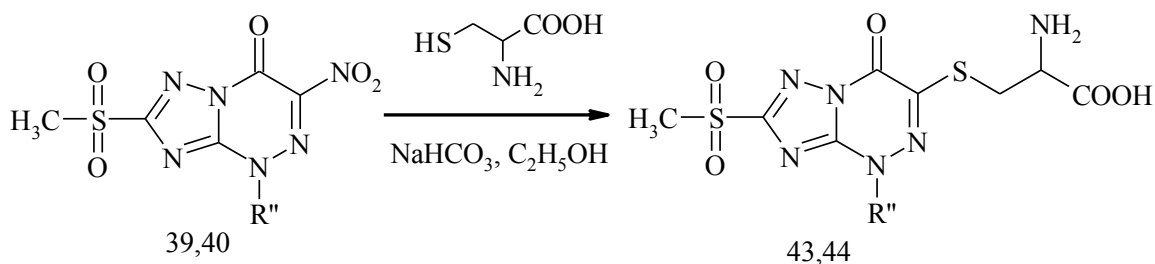
2-Метилтио-4- R^1 -1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-оны (2a, 3a, 6a, 7a), как и соединения (1a, 33б-г), легко окисляются до соответствующих сульфонов (39-42) действием избытка пероксида водорода (схема 17). Спектры ^1H ЯМР полученных соединений (39-42) характеризуются присутствием сигналов протонов метилсульфонильной группы ($\delta=3,0\div3,5$ м.д.), а также сигналами протонов N-алкильных групп. В ИК-спектрах присутствуют характерные полосы поглощения карбонильной, нитро- и сульфонильной групп.

Схема 17



При взаимодействии триазоло-1,2,4-триазинов (39,40) с цистеином при комнатной температуре происходит замещение нитрогруппы с сохранением метилсульфонильного фрагмента и образованием соединений (43,44) (схема 18), о чем свидетельствуют данные ^1H ЯМР и ИК-спектроскопии.

Схема 18



В ^1H ЯМР спектрах соединений (43,44) присутствуют сигналы цистеинового фрагмента в виде трех дублетов дублетов, алкильной защиты и трехпротонный синглет метилсульфонильной группы в области 3.28 м.д. В ИК-спектрах также присутствуют характеристические полосы поглощения сульфонильного фрагмента и отсутствуют характеристические частоты, принадлежащие нитрогруппе.

Условия получения 1,2,4-триазоло[5,1-с]1,2,4-триазинов с цистеиновым фрагментом свидетельствуют о том, что в физиологических условиях возможен катализ синтеза таких соединений, что соответствует ряду известных биохимических реакций, включая S- гуанилирование компонентов сигнальной редокс-системы¹⁰ и модификацию клеточных и вирусных белков 8-нитрогуанозином¹¹. Активация этих процессов характерна для гиперпродукции NO и пероксинитрита.

Таким образом, проведенные модельные реакции свидетельствуют о возможности протекания метаболических процессов для препарата «Триазавирин» и его аналогов, связанных не только с восстановлением нитрогруппы, но и с окислением алкилтиольного фрагмента, а также замещением нитро- или алкилсульфонильной группы.

5. Исследование противовирусного действия продуктов S-окисления

В ходе исследования для проверки гипотезы о возможности выступления продуктов S-окисления «Триазавирина» и его аналогов (1а, 33б-г) в качестве их метаболитов, ответственных за противовирусное действие, были проведены биологические испытания *in vitro* для соединений (34а-г и 35а-г) (таблица 1).

Из таблицы 1 видно, что большинство исследованных соединений обладают противовирусным действием. S-Окисление соединений (1а, 33б-г) не вызывает существенных изменений в противовирусной активности в опытах *in vitro*, что свидетельствует о независимости антивирусной активности от степени окисления S-алкильного заместителя во 2-ом положении триазоло-1,2,4-триазинового цикла. Вместе с тем, очевидно, что такие метаболические модификации могут явиться проявлением частичных антиоксидантных свойств «Триазавирина», что не может не отражаться на

таких существенных свойствах, как биодоступность и интерференция с другими сульфосодержащими препаратами.

Таблица 1. Данные биологических испытаний некоторых синтезированных соединений

Шифр	Соединение	МТД мкг/мл	Рабочая концентрация, мкг/мл	Противовирусная активность (снижение инфекционной способности вируса в lg ИД _{50/20} мкл)	
				A(H1N1) A/Puerto Rico/8/34	A(H3N2) A/Victoria/35/72
MNR-558	34a	>200	100	1,0	1,0
MNR-560	34b	>200	100	0,5	0,5
MNR-562	34c	>200	100	1,0	1,0
MNR-564	34d	>200	100	1,0	1,0
MNR-557	35a	>200	100	0,0	0,0
MNR-559	35b	>200	100	0,5	0,5
MNR-561	35c	>200	100	0,0	0,0
MNR-563	35d	>200	100	1,0	1,0

Исследования противовирусной активности цистеиновых производных (соединения 21) показало, что в отличие от нитро-производных азоло-1,2,4-триазинов они проявляют высокий уровень противовирусной активности *in vitro*. Наибольшую активность показало соединение (21г) - 4 lg ИД_{50/20} мкл

Заключение

Таким образом, проведенные модельные реакции свидетельствуют о возможности протекания метаболических процессов для препарата «Триазавирин» и его аналогов, связанных не только с восстановлением нитрогруппы, но и с окислением алкилтиольного фрагмента, а также замещением нитро- или алкилсульфонильной группы.

На основе биологических испытаний можно предположить, что действие препаратов на основе нитро-производных триазоло-1,2,4-триазинов реализуется *in vivo* через взаимодействие с клеточными тиолами. Домен вирусных белков, содержащие экспонированные остатки цистеинов, скорее всего являются мишенью для реакций типа S - гуанилирования, в которых природное основание гуанин, замещено пуриноподобными молекулами триазоло-1,2,4-триазинов.

Список использованных источников

- ¹ Denicola A., Radi R., Peroxynitrite and drug-dependent toxicity, *Toxicology*, 2005, vol. 208, p. 273-288.
- ² Szabo C., Ischiropoulos H., Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007, vol. 6, p. 662-680.
- ³ Ulomskii, E. N.; Rusinov, V. L.; Chupakhin, O. N.; Rusinov, G. L.; Chernyshev, A. I.; Aleksandrov, G. G., Nitroazines. 7. Alkylation of 6-nitro-7-oxo-4,7-dihydroazolo[5,1-*c*]-1,2,4-triazines and Identification of the products // *Chem. Het. Comp.*, 1987, Vol. 23, No. 11, p. 1236-1243.
- ⁴ RU Pat. 2404182; *Chem. Abstrs.*, 2008, Vol.153, 634822.
- ⁵ RU Pat. 2402552; *Chem. Abstrs.*, 2008, Vol.153, 546728.
- ⁶ RU Pat 2294936 ; *Chem. Abstrs.*, 2007, Vol.146, 316949.
- ⁷ Русинов В.Л., Уломский Е.Н., Чупахин О.Н., Зубаиров М.М., Капустин А.Б., Митин Н.И., Жиравецкий М.И., Виноград И.А. Синтез и противовирусная активность 6-нитро-7-оксо-4,7-дигидроазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов. *Хим.-фарм. журнал*, 1990, №9, с.41-44.
- ⁸ Русинов В.Л., Уломский Е.Н., Чупахин О.Н., Петров А.Ю., Шаронов Е.А. Нитроазины. 9. Особенности нуклеофильного замещения в дигидроазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов. *ХТС*, 1989, №2, с.253-257.
- ⁹ Л. Г. Егорова, А. Ю. Петров, В. Л. Русинов. NH-кислотность 7-оксо-4,7-дигидропиразоло- и 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов. *ХТС*, 1984, №5, с.697-699.
- ¹⁰ Sawa T., Zaki M.H., Okamoto T., Akuta T., Tokutomi Y., Kim-Mitsuyama S., Ihara H., Kobayashi A., Yamamoto M., Fujii S., et al. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nat. Chem. Biol.*, 2007, Vol. 11, p. 727-735.
- ¹¹ Akaike T., Fujii S., Sawa T., Ihara H. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. *Nitric Oxide*. 2010, Vol. 3, p. 166-174.